Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DIE BEDEUTUNG DES RIFAMPICIN-CHINONS BEI DER IRREVERSIBLEN BINDUNG VON RIFAMPICIN AN MAKROMOLEKULARE SUBSTANZEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

HILDEGARD GASSENMAIER, geb. Remmer

aus Berlin

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0051

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen

Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

DIE BEDEUTUNG DES RIFAMPICIN-CHINONS BEI DER IRREVERSIBLEN BINDUNG VON RIFAMPICIN AN MAKROMOLEKULARE SUBSTANZEN

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizin

dem Fachbereich Theoretische Medizin

der Eberhard-Karls-Universität

zu Tübingen

vorgelegt von

HILDEGARD GASSENMAIER, geb. Remmer

aus Berlin

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H.J. Mallach
1. Berichterstatter: Privatdozent
Dr. med. Dr. rer.nat. H.M. Bolt
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Siess

Gesamtherstellung: **aku** - Fotodruck GmbH, 8600 Bamberg

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	3
2.1.	Material	3
2.2.	Messung der Radioaktivität	3
2.3.	Vorbehandlung der Versuchstiere	4
2.4.	Präparation der Lebermikrosomen	4
2.5.	Inkubation der Lebermikrosomen	5
2.6.	Inkubation mit Leberhomogenat	6
2.7.	Autoxidation des Rifampicins zum Rifampicinchinon	6
2.8.	Extraktion von reversibel an Proteine oder Nukleinsäuren gebundenem Rifampicin	7
2.9.	Irreversible Bindung an makromolekulare Verbindungen in vitro	7
2.10.	Irreversible Bindung von Rifampicin-metaboliten an Proteine und Nukleinsäuren in vivo	8
2.11.	Solubilisierung und Reinigung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	10
2.12.	Bestimmung der mikrosomalen NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und der Reduktion von Rifampicinchinon	10
2.12.	Statistische Auswertung	11

Seite

3. ERGEBNISSE 12

3.1. Inkubationsergebnisse 12

3.2. Autoxidation von Rifampicin und irreversible Bindung von Rifampicinchinon an makromolekulare Verbindungen 15

3.3. Irreversible Bindung von Rifampicin an Makromoleküle in vivo 21

3.4. Reduktion von Rifampicinchinon durch die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase 23

3.5. Induktionsexperimente 28

4. DISKUSSION 30

5. ZUSAMMENFASSUNG 33

6. LITERATURVERZEICHNIS 35

1. EINLEITUNG

Bei der Behandlung der Tuberkulose wird Rifampicin in grossem Umfang benutzt. Jedoch ist zunehmend von ernsten Nebenwirkungen berichtet worden, die auf allergische Reaktionen in verschiedenen Organen zurückzuführen sind (BOLT 1975) und zwar von Thrombocytopenie (BLAICMANN und Mit., 1971), Hämolyse und akutem Nierenversagen infolge einer allergischen interstitiellen Nephritis (POOLE und Mitarb., 1971; SCHUBOTHE und Mitarb., 1972). Diese Nebenwirkungen stehen offensichtlich in Verbindung mit dem Vorkommen von humoralen Antikörpern gegen Rifampicin (POOLE und Mitarb., 1971; PUJET und Mitarb., 1974). SCHUBOTHE und Mitarb. (1972) haben betont, daß die Rifampicinantikörper ganz spezifisch gegen Rifampicin allein gerichtet sind. Sie haben bei Patienten, die an einer durch Rifampicin induzierten Hämolyse erkrankt waren, nachgewiesen, daß nur Rifampicin selbst an die Antikörper gebunden wird, nicht aber die Muttersubstanz Rifamycin. Die Sensibilisierung des Organismus gegen Rifampicin setzt aber die Bildung eines Haptenkomplexes aus dem Arzneimittel selbst oder eines seiner Stoffwechselprodukte mit einer makromolekularen Verbindung voraus.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, zu zeigen, daß das Stoffwechselprodukt Rifampicinchinon unter physiologischen Bedingungen irreversibel an Proteine gebunden werden kann. Vermutlich geschieht diese Bindung an die freien Aminogruppen der Lysinreste, wie es am Beispiel von Poly-L-Lysin gezeigt wird. Zudem wird ein Mechanismus im Organismus aufgezeigt, der die Akkumulation größerer Mengen des

reaktiveren Metaboliten Rifampicinchinon durch Reduktion zum Ausgangsprodukt Rifampicin verhindern kann. Dies erklärt auch, daß in vivo nur vergleichsweise geringe Mengen von Rifampicin irreversibel an Proteine und Nucleinsäuren von Leber und Gehirn gebunden werden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

43 $^{-3}$H-Rifampicin (9,3 µ Ci/mg) und nicht radioaktives Rifampicin wurde freundlicherweise von der Firma Lepitit S.p. A., Mailand, Italien, zur Verfügung gestellt. Rifampicinchinon und mit Tritium markiertes Rifampicinchinon wurden aus diesen Materialien nach der Methode von MAGGI und Mitarbeitern (1966) hergestellt. DNS aus Sperma von Heringen und Poly-L-Lysin mit einem Molekulargewicht M = 100 000 wurden von der Firma Serva, Heidelberg, Rinderserumalbumin von den Behringwerken Marburg und RNS aus Hefe von Boehringer Mannheim bezogen.

2.2. Messung der Radioaktivität

Die Radioaktivität wurde nach Auflösen der Substanzproben in Hyaminhydroxid in der von BRAY (1960) angegebenen Szintillationslösung im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Mit Hilfe der Methoden der internen bzw. externen Standardisierung wurde die Größe des bei der Szintillationslösung auftretenden Löscheffekts bestimmt und die Meßwerte entsprechend korrigiert. Die Ergebnisse wurden dann in Mol umgerechnet. Aufgrund der spezifischen Radioaktivität der eingesetzten Substanz und der Menge zugesetzter nicht radioaktiver Substanz wurde die spezifische Radioaktivität für jeden einzelnen Versuch ausgerechnet und daraus die absolute Menge der Substanz bestimmt.

2.3. Vorbehandlung der Versuchstiere

Die vorliegenden Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an Albinoratten vom Wistar-Stamm mit einem Körpergewicht von 200 g und Albinomäusen mit einem Körpergewicht von 30 g. Um die Synthese der Arzneimittel metabolisierenden Enzyme der Leber zu induzieren, wurden die Tiere mit Phenobarbital vorbehandelt:
Nach einer einmaligen intraperitonealen Gabe von 80 mg/kg KG Phenobarbital in H_2O erhielten sie 4 Tage lang 0,1 % Phenobarbital im Trankwasser.
Mit Rifampicin vorbehandelte Ratten erhielten das Medikament oral für 5 Tage in einer Dosis von 20 mg/kg KG. Dazu wurde Rifampicin in Wasser suspendiert und durch eine genügend große Menge von 4 M NaOH in Lösung gebracht. 2 Tage später erfolgten die Untersuchungen.

2.4. Präparation der Lebermikrosomen

Die Lebern wurden in der üblichen Weise nach REMMER und Mitarb. (1967) präpariert:
Nach Dekapitation wurden die Lebern der Tiere sofort in eiskalter 0,25 M Saccharoselösung, die 5,5 mM ÄDTE (Äthylendiamin-tetraessigsäure) und 0,02 M Tris enthielt (pH Wert der Lösung = 7,5), gekühlt und anschließend homogenisiert. Nach Abzentrifugieren der Zelltrümmer, Kerne und Mitochondrien bei 7000 g über 10 Minuten wurde der verbleibende Überstand 60 Minuten in der Ultrazentrifuge mit 105 000 g zentrifugiert und die sedimentierten Mikrosomen in KCl/HCl-Puffer, p_H = 7,4 suspendiert und nochmals

bei 105 000 g 60 Minuten lang zentrifugiert. Dann wurde das Sediment in KCl / Tris-Puffer-Lösung suspendiert, so daß in 1,0 ml Suspension die Mikrosomen von ca. 0,5 g Leber enthalten waren.
Der Proteingehalt der Lösung wurde nach der Methode von LOWRY und Mitarb. (1951) bestimmt und bewegte sich zwischen 5,5 und 8,5 mg Protein/ml.

2.5. Inkubation der Lebermikrosomen

Die Inkubationsbedingungen wurden je nach Fragestellung variiert und werden bei den jeweiligen Resultaten angeführt. Zur Bereitstellung von NADPH, des Cofaktors der mischfunktionellen Oxidase der Lebermikrosomen, wurde das NADPH regenerierende System nach REMMER und Mitarb. (1967) verwendet, das die Isozitrat-dehydrogenase als regenerierendes Enzym benutzt. Als Puffer diente 0,25 M Tris Puffer, p_H = 7,5, weil das p_H Optimum der mischfunktionellen Oxidase in diesem Bereich liegt.
Der Inkubationsansatz enthielt:

ca. 1,6 - 2,5 mg	mikrosomales Protein
0,05 M	Tris/HCl-Puffer p_H = 7,5
0,12 M	KCl
5 µMol	$MgCl_2$
8 µMol	Isozitrat-Na
1 µMol	NADP-Na
5 µMol	Isozitrat-dehydrogenase (Boehringer)

sowie das jeweilige Substrat.

2.6. Inkubation mit Leberhomogenat

Die Lebern von weiblichen Ratten mit einem Körpergewicht von 200 g wurden in 0,07 M Phosphatpuffer mit einem p_H = 7,4 homogenisiert. 1 ml dieses Homogenats entsprach 100 mg Leberfeuchtgewicht. Ein Teil des Homogenats wurde ohne Rifampicin durch 30 Minuten langes Kochen im Wasserbad denaturiert.
Die Inkubationslösung von 0,4 ml enthielt:

Homogenat von 30 mg Leber
11,3 µg ^{3}H-Rifampicin
und jeweils 1 µMol der folgenden Cofaktoren in Phosphatpuffer: NAD, NADH, NADP, NADPH.

Die Inkubation erfolgte bei 37° C über 60 Minuten.

2.7. Autoxidation des Rifampicins zum Rifampicinchinon

Die Autoxidation des Rifampicins wurde nach der Methode von MAGGI und Mitarb. (1966) bestimmt, nur führten wir die Autoxidation bei physiologischem pH durch.
250 µmol Rifampicin wurden in 200 ml Phosphatpuffer von p_H = 7,4 gelöst und 11 Tage lang bei 37° C inkubiert. Die Oxidation des Rifampicins zum Rifampicinchinon wurde spektrophotometrisch verfolgt, wie es bereits MAGGI und Mitarb. (1966) gezeigt hatten. Die Absorptionsmaxima lagen dabei bei 480 nm bzw. bei 540 nm.
Die Hemmung der Oxidation erfolgte durch Zusatz von Ascorbat bei einem p_H = 7,4.

2.8. Extraktion von reversibel an Proteine oder Nucleinsäuren gebundenem Rifampicin

Um die Inkubationen zu beenden wurde soviel Äthanol hinzugefügt bis eine 70 %ige Lösung entstand. Die präzipitierten Proteine wurden dreimal mit kaltem 70 %igen Äthanol und einmal mit kochendem Äthanol extrahiert. Anschließend folgten 3 Extraktionen mit Äthylacetat. Durch diese Verfahren wurde alles nicht irreversibel gebundene Rifampicin und seine Metabolite entfernt. Nach der Extraktion erfolgte die Messung der Proteinmengen nach der Methode von LOWRY und Mitarb. (1951). Die erhaltenen Werte wurden für die während der Extraktion verloren gegangene Proteinmenge korrigiert. Die Nucleinsäuren wurden bei einer Temperatur von -25° C nach Zufügen von Äthanol bis zur 70 %igen Lösung quantitativ gefällt. Anschließend folgten noch einige weitere Extraktionen mit 70 %igen Äthanol, wobei sie nach jedem Schritt 24 Stunden bei -25° C aufbewahrt wurden, um ein vollständiges Ausfällen der Nucleinsäuren zu gewährleisten.

2.9. Irreversible Bindung an makromolekulare Verbindungen in vitro

Der zeitliche Verlauf der irreversiblen Bindung von Rifampicin und seines Chinons an Proteine und Nucleinsäuren wurde durch Inkubation von 10 mg Albumin oder RNS mit dem Substrat bei 37° C in Phosphatpuffer bei einem p_H = 7,4 bestimmt.

2.10. Irreversible Bindung von Rifampicinmetaboliten an Proteine und Nucleinsäuren in vivo

Männliche Albinoratten mit einem Körpergewicht von 130 g erhielten eine einmalige Gabe von 5,25 µmol (0,1 mCi) ^{3}H-Rifampicin (spez. Aktivität 19,08 mCi / mMol) gelöst in 0,25 ml 1,8 % NaCl plus 0,25 ml Dimethylsulfoxid. Die Dosis betrug 33 mg/kg Körpergewicht. Die Messungen erfolgten nach 48 Stunden. Die Radioaktivität, die an Proteine, DNS und RNS von Leber und Gehirn gebunden worden war, wurde nach einer Modifikation der Methode von GEORGIEV und MANTIEVA (1962) und SHERRER und DARNELL (1962) gemessen.
Die Organe wurden mit kalter physiologischer Kochsalzlösung gespült, die 30 µg Polyvinylsulfat in 10 ml enthielt. Anschließend wurden die Organe im 10-fachen Volumen eines Puffers aus 0,03 M Phosphatpuffer p_H = 6,8, 0,14 M NaCl und 0,1 ml 0,03 % Polyvinylsulfat / 10 ml homogenisiert.

Die RNS wurde bei 20° C und bei 65° C ausgefällt, um sowohl die zytoplasmatische RNS als auch die RNS des Zellkerns zu erhalten. Dem Homogenat wurde ein gleich großer Teil Phenol zugefügt und anschließend über 15 Minuten bei 20° C geschüttelt und mit einer Beschleunigung von 25300 g zentrifugiert. Der Niederschlag, die Phenolphase und der wässrige Überstand wurden getrennt.
Die Phenolphase wurde mit dem gleichen Volumen eines Puffers aus 0,03 M Phosphatpuffer p_H = 6,8; 0,1 ml 0,03 % Polyvinylsulfat / 10 ml und 0,5 ml 10 % Natrium-Dodecylsulfat / 10 ml verdünnt.

Die RNS des Zellkerns erhielten wir in der wässrigen Phase durch Extraktion bei 65° C und anschließendem Zentrifugieren mit einer Beschleunigung von 10 000 g. Dann wurde die RNS-Lösung dreimal mit Äther extrahiert, um das restliche Phenol zu entfernen. Zu 1 Volumen RNS wurde die doppelte Menge Äthanol zugefügt und die RNS innerhalb von 24 Stunden bei -25° C gefällt.

Der Niederschlag des Organhomogenats wurde in 0,5 M KOH suspendiert, bei 30° C für 15 Stunden inkubiert und anschließend mit $HClO_4$ neutralisiert und zentrifugiert. Der Überstand enthielt die hydrolisierte restliche RNS. Der Niederschlag wurde erneut in 0,5 M $HClO_4$ suspendiert, für eine Stunde im Wasserbad erhitzt und mit KOH neutralisiert und zentrifugiert. Dieser Überstand enthielt die hydrolysierte DNS, der Niederschlag das Protein. Anschließend wurden diese Fraktionen wieder mehrmals mit 70 %igem Äthanol bei -25° C extrahiert.

Die Messung der Radioaktivität erfolgte nach Lösung in Hyaminhydroxid in Brays Lösung (BRAY, 1960).

2.11. Solubilisierung und Reinigung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase

Die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase wurde durch Trypsinbehandlung aus Lebermikrosomen von mit Phenobarbital vorbehandelten Ratten gewonnen und durch Gelfiltration mit Sephadex-G-100 bzw. Papierelektrophorese gereinigt (MASSEY, 1959; OMURA und Mitarb., 1967; OMURA und TAKESU, 1970):

Gewaschene Mikrosomen wurden in 0,1 M Phosphatpuffer p_H = 7,5 suspendiert. 3 mg kristallisiertes Trypsin wurden in 1 ml 2 mM HCl gelöst und zu je 10 ml der Mikrosomensuspension zugegeben und bei 0° C über 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde 90 Minuten mit 100 000 g zentrifugiert, der Überstand durch Lyophilisierung auf ca. 3 ml konzentriert und einerseits auf eine mit 0,01 M Phosphatpuffer p_H = 7,5 äquilibrierte Sephadex-G-100 Säule gegeben, andererseits durch Papierelektrophorese mit einer Spannung U = 400 V bei p_H = 7,4 nach 30 Minuten analysiert. Als Puffer diente hierbei "Mikrophor" (Firma Boskamp, Hersel, Deutschland).

2.12. Bestimmung der mikrosomalen NADPH-Cytochrom-c-Reduktase und der Reduktion von Rifampicinchinon

Die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase wurde nach WILLIAMS und KAMIN (1962) bei 37° C bestimmt. Die Reduktion des Rifampicinchinons wurde spektrophotometrisch bei 540 nm nach BOLT und Mitarb. (1975) bestimmt. Die Konzentration des Rifampicinchinons betrug dabei 20 µM.

2.13. Statistische Auswertung

Die statistische Beurteilung des Zahlenmaterials erfolgte durch Mittelwertsvergleiche mit dem Student-Test nach Prüfung auf Normalverteilung.
Als Signifikanzniveau wurde in allen Fällen $p = 0{,}05$ verwendet. Unterschiede zwischen zwei Mittelwerten wurden als signifikant (s.) bezeichnet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit p kleiner als 0,05 war und als nicht signifikant (n.s.) angegeben, wenn diese über 0,05 lag.

Angaben zur Streuung beziehen sich im Text, in Abbildungen und Tabellen jeweils auf den mittleren Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$).

3. ERGEBNISSE

3.1. Inkubationsergebnisse

Bei der Inkubation von ^{3}H-Rifampicin mit Lebermikrosomen wurden nur sehr geringe Mengen von radioaktiv markiertem Rifampicin irreversibel an Proteine gebunden (Tabelle 1). Dabei fanden wir Speziesunterschiede zwischen den Mikrosomen von Ratten und Mäusen. Während durch Hinzufügen von NADP und einem NADP regenerierendem System die Bindung von Rifampicin an Rattenlebermikrosomen nicht zu beeinflussen war, wurde die irreversible Bindung von ^{3}H-Rifampicin an Mäuselebermikrosomen in Gegenwart von NADP um das Dreifache erhöht.
Das Verhalten der Bindung von Rifampicin an Rattenlebermikrosomen ließ eine nichtenzymatische Bindung vermuten. Die Vermutung wurde durch die Inkubation von ^{3}H-Rifampicin mit Rattenleberhomogenat und mit verschiedenen Kofaktoren gestärkt. Die Gegenwart von NAD, NADH, NADP und NADPH hatte keinen Einfluß auf das Ausmaß der irreversiblen Bindung von ^{3}H-Rifampicin an Proteine. Die Bindung wurde auch nicht durch das Kochen des Leberhomogenats aufgehoben. Daraus kann gefolgert werden, daß die irreversible Bindung von Rifampicin an Proteine auf nicht enzymatischen Wege erfolgt. Die Zunahme der Bindung bei Inkubation mit gekochtem Leberhomogenat kann dadurch erklärt werden, daß bei Denaturierung durch die Entfaltung der Eiweißketten mehr funktionelle Gruppen der Aminosäuren für die Reaktion zur Verfügung stehen (Tabelle 2).

	^{3}H-Rifampicin (pmol/mg) gebunden an Lebermikrosomen von	
	Ratten	Mäusen
Inkubation ohne NADP und ohne NADP regenerierendes System	21,8 ± 5,5 (n = 3)	6,5 ± 0,65 (n = 3)
Inkubation mit NADP und mit NADP regenerierendem System	21,2 ± 4,6 (n = 3)	19,0 ± 0,65 (n = 4)

Tabelle 1: Irreversible Bindung von Rifampicin an mikrosomale Leberproteine.

Lebermikrosomen von Ratten und Mäusen, die mit Phenobarbital vorbehandelt worden sind, wurden mit 13,7 nmol ^{3}H-Rifampicin in 1 ml über 60 min bei 37° C inkubiert. Die angegebenen Werte drücken die Menge Rifampicin in pmol aus, die irreversibel an 1 mg mikrosomales Protein gebunden wird.

Angaben zur Streuung beziehen sich wie in den folgenden Tabellen und Abbildungen jeweils auf den mittleren Fehler des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$).

	^{3}H-Rifampicin (pmol/mg) gebunden an	
	unverändertes Homogenat (n = 3)	gekochtes Homogenat (n = 3)
Ohne Kofaktor	3,4 ± 0,17	5,4 ± 0,82
2,5 mM NAD	3,0 ± 0,40	5,9 ± 0,67
2,5 mM NADH	3,7 ± 0,53	5,8 ± 0,62
2,5 mM NADP	2,7 ± 0,11	4,8 ± 0,42
2,5 mM NADPH	3,4 ± 0,34	6,5 ± 0,82

Tabelle 2: Irreversible Bindung von Rifampicin an Rattenleberhomogenat.

14 nmol ^{3}H-Rifampicin wurden mit unverändertem und gekochtem Rattenleberhomogenat in 0,4 ml bei einer Temperatur T = 37° C über 60 Minuten inkubiert. Die Werte drücken die Menge Rifampicin in pmol aus, die irreversibel an 1 mg mikrosomales Protein gebunden wurde.

3.2. Autoxidation von Rifampicin und irreversible Bindung von Rifampicinchinon an makromolekulare Verbindungen

Nachdem durch BOLT und KAPPUS (1974) aufgezeigt worden war, daß Chinonstrukturen sich kovalent an funktionelle Gruppen von Aminosäuren binden können, prüften wir die Fähigkeit von Rifampicinchinon, eine irreversible Bindung mit Proteinen einzugehen. MAGGI und Mitarb. (1966) hatten gezeigt, daß Rifampicin bei alkalischem p_H instabil ist, was auf der Autoxidation zum Rifampicinchinon beruht.
Um die Stabilität des Hydrochinonanteils von Rifampicin zu prüfen, wurde Rifampicin bei physiologischem p_H und unter Luftzufuhr in Phosphatpuffer (0,1 m; p_H = 7,4) bei 37° C über 260 Stunden inkubiert. Abbildung 1 zeigt die Abnahme von Rifampicin in der Lösung in Abhängigkeit von der Autoxidation. Die Autoxidation wurde durch Hinzufügen von 1 mM Ascorbinsäure in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von MAGGI und Mitarb. (1966) gehemmt. Bei physiologischem p_H schritt die Autoxidation allerdings nicht so schnell voran, wie MAGGI und Mitarb. (1966) es bei einem p_H = 8,24 beobachtet hatten.

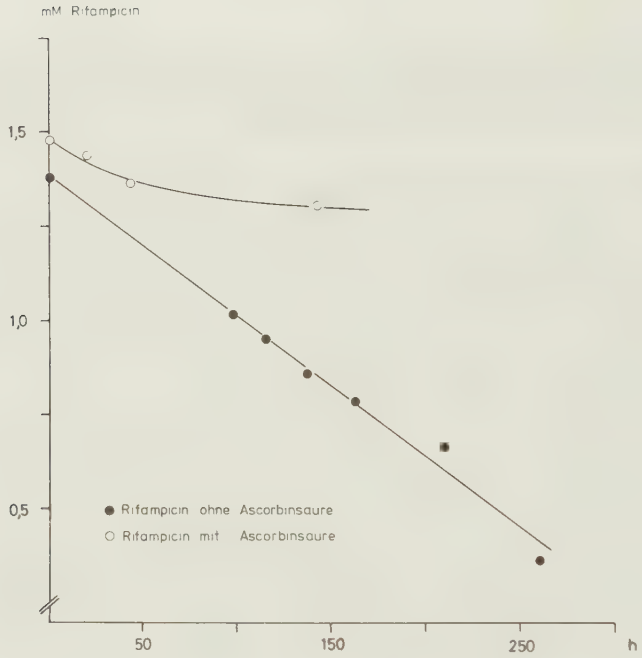

Abbildung 1: Autoxidation von Rifampicin

Rifampicin wurde in Phosphatpuffer (p_H = 7,4) inkubiert und spektrophotometrisch nach MAGGI und Mitarb. (1966) bestimmt. 1 mM Ascorbinsäure schützte Rifampicin vor Autoxidation.

● Rifampicin ohne Ascorbinsäure

○ Rifampicin mit Ascorbinsäure

Abbildung 2 zeigt die nichtenzymatische irreversible Bindung von ^{3}H-Rifampicin und ^{3}H-Rifampicinchinon an Albumin. Nach 48-stündiger Inkubation wurden 16,6 pmol Rifampicinchinon gebunden, vom Rifampicin selbst aber nur 7,8 pmol.

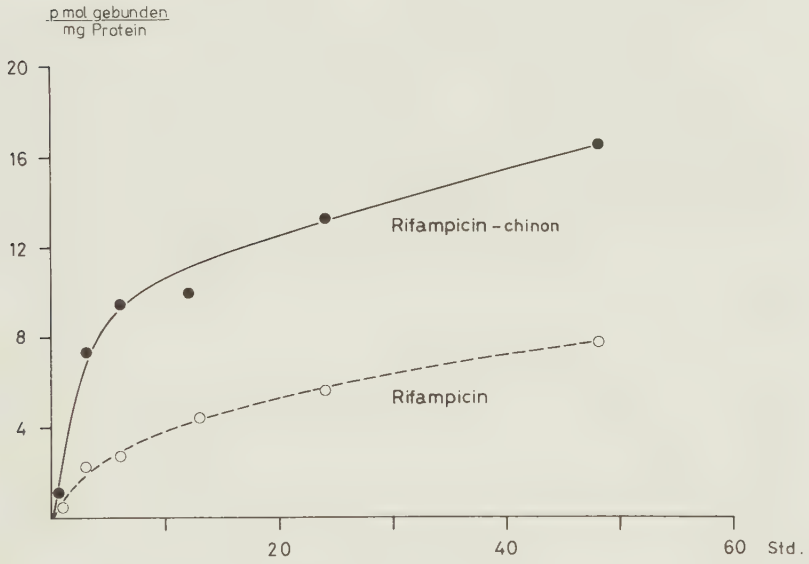

Abbildung 2: Zeitverlauf der nichtenzymatischen irreversiblen Bindung von Rifampicin und Rifampicinchinon an Albumin.

10 mg Albumin und 6,66 nmol ^{3}H-Rifampicin bzw. ^{3}H-Rifampicinchinon wurden pro ml Phosphatpuffer (p_H = 7,4) bei T = 37° C inkubiert.

Wurde Rifampicinchinon mit RNS inkubiert, so wurde an RNS eine etwa gleich große Menge wie an Albumin gebunden.

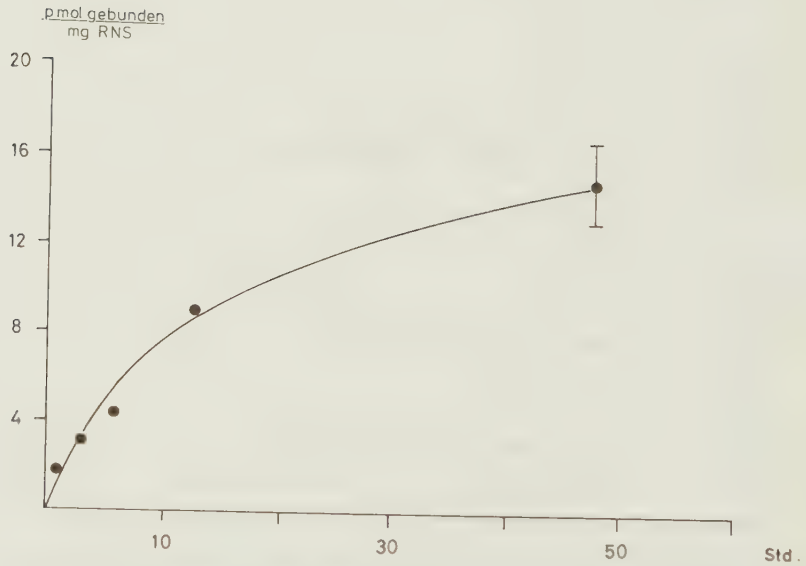

Abbildung 3: Zeitverlauf der nichtenzymatischen irreversiblen Bindung von Rifampicinchinon an RNS.

Die Konzentration von RNS betrug 10 mg/ml.
Übrige Erklärungen bei Abbildung 2.

Um herauszufinden, was die chemische Natur der Bindung zwischen Rifampicinchinon und den makromolekularen Verbindungen ist, wurden einige Experimente mit Poly-L-Lysin durchgeführt. Abbildung 4 zeigt, daß im Vergleich zu Albumin mehr Rifampicinchinon an Poly-L-Lysin gebunden wurde. Dies läßt die Vermutung zu, daß die Bindung von Rifampicinchinon an Proteine über die ε-Aminogruppe des Lysins, das ja auch in Proteinen vorkommt, gehen könnte. Jedoch ist die Affinität von Rifampicinchinon zu solchen Aminogruppen erheblich geringer als die von reaktiveren Chinonen, wie z.B. Östrogenderivate (BOLT und KAPPUS, 1974). Dies zeigte der im Vergleich dazu geringe Betrag von Rifampicinchinon, der an Poly-L-Lysin gebunden wurde.

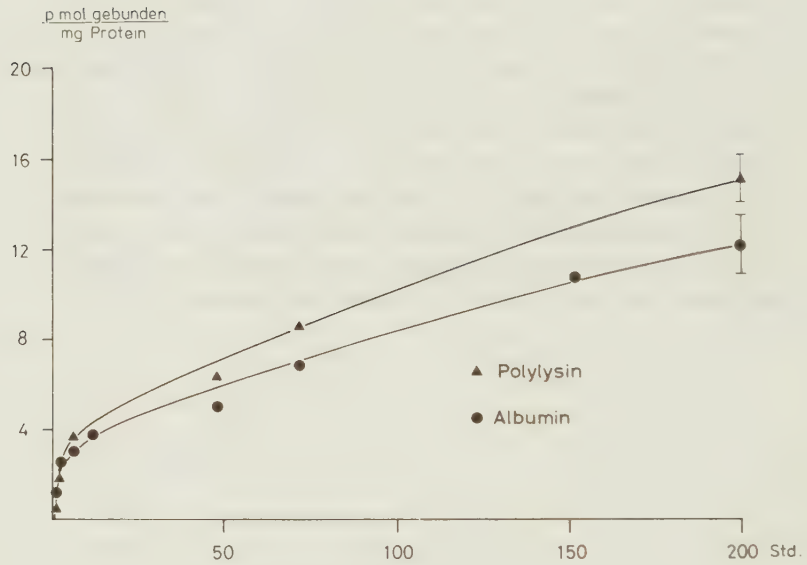

Abbildung 4: Zeitverlauf der nichtenzymatischen irreversiblen Bindung von Rifampicinchinon an Albumin und Poly-L-Lysin.

10 mg Albumin bzw. 10 mg Poly-L-Lysin wurden mit 3 nmol ^{3}H-Rifampicinchinon pro ml Phosphatpuffer (p_H = 7,4) bei T = 37° C inkubiert.

3.3. Irreversible Bindung von Rifampicin an Makromoleküle in vivo

48 Stunden nach intraperitonealer Gabe von 5,25 µmol ^{3}H-Rifampicin an Ratten wurden nur geringe Beträge von Radioaktivität an Gewebeproteine von Leber und Gehirn gebunden, ebenso an die RNS der Leber (Tabelle 3). Die nur sehr geringe Menge irreversibel gebundenen Rifampicins ließ einen Stoffwechselweg vermuten, der Rifampicinchinon daran hindert, eine Bindung einzugehen.

Die folgenden Experimente sollten daher zeigen, wie eine Reduktion des Rifampicinchinons zu Rifampicin erfolgen könnte.

	^{3}H-Rifampicin (pmol/mg) gebunden an Makromoleküle aus	
	Leber (n = 4)	Gehirn (n = 4)
RNS	29,2 ± 4,15	-
DNS	-	-
Protein	15,8 ± 8,1	5,0 ± 0,47

Tabelle 3: Irreversible Bindung von Rifampicin an makromolekulare Verbindungen in vivo.

48 Stunden nach einer intraperitonealen Gabe von 5,25 µmol ^{3}H-Rifampicin an Ratten mit einem Körpergewicht von 130 g wurden diese Mengen irreversibel an Proteine und RNS aus Leber und Gehirn gebunden. Die Werte drücken die Menge Rifampicin in pmol aus, die irreversibel an 1 mg Makromoleküle gebunden wurde.

Abkürzungen siehe Tabelle 1.

Nicht mehr meßbare Radioaktivitätsmengen sind mit einem Strich (-) gekennzeichnet.

3.4. Reduktion von Rifampicinchinon durch die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase

Rattenlebermikrosomen können bei Anwesenheit von NADPH und einem regenerierendem System Rifampicinchinon reduzieren. Abbildung 5 zeigt die Kinetik dieser Reaktion, wobei die Mikrosomen von Ratten, die mit Phenobarbital vorbehandelt worden waren, benutzt wurden. Die Michaeliskonstante betrug $K_m = 10^{-4}$ M und V_{max} = 310 nmol Rifampicinchinon/mg mikrosomales Protein/Minute.

Bekanntlich katalysiert die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase die Reduktion sehr vieler verschiedener Chinonverbindungen (MASTERS und Mitarb. 1967; GOLF und Mitarb. 1974).

Die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase wurde mit Trypsin aus den Lebermikrosomen solubilisiert und durch Gelfiltration mit Sephadex G-100 gereinigt. Abbildung 6 zeigt die Elutionskurve.

Im Eluat wurde einerseits die Reduktion von Cytochrom-c, andererseits die von Rifampicinchinon nach Zusatz von NADPH gemessen. Beide Aktivitäten sind der gleichen Elutionsfraktion zugeordnet.

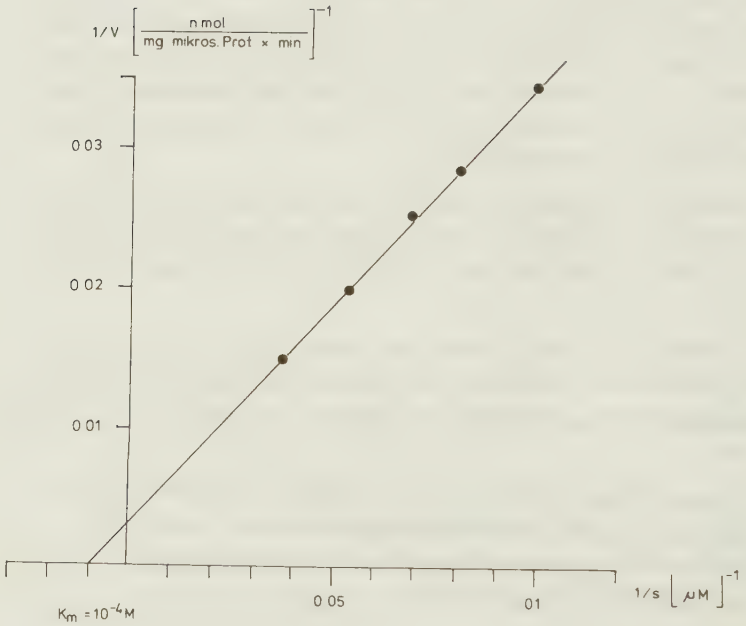

Abbildung 5: Reduktion von Rifampicinchinon durch Lebermikrosomen in der Auftragung von LINEWEAVER-BURK ($\frac{1}{v}$ gegen $\frac{1}{s}$).

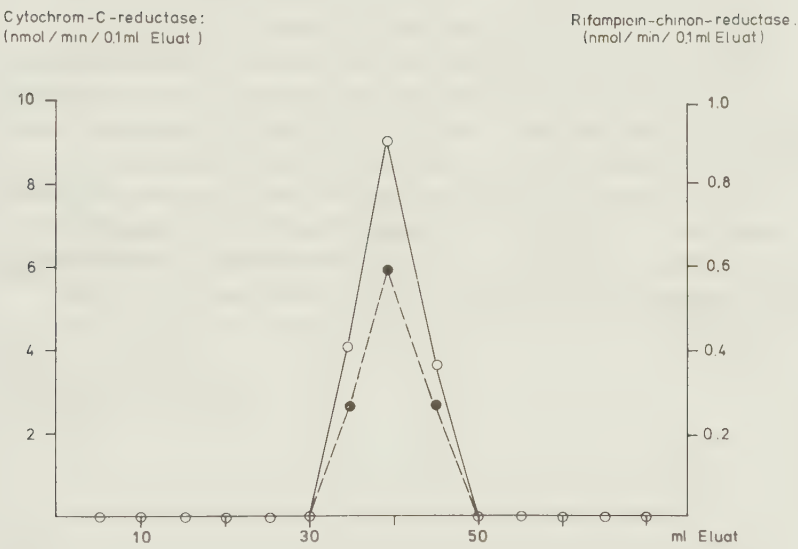

Abbildung 6: Gelfiltration der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase aus Rattenlebermikrosomen mit Sephadex G - 100.

○ Reduktion von Cytochrom c

● Reduktion von Rifampicinchinon

Tabelle 4 zeigt das Verhältnis der Reduktaseaktivität von Cytochrom-c-Reduktase zu Rifampicin-Reduktase unter verschiedenen Bedingungen. In natürlichen Mikrosomen wurde ein Verhältnis von 9,6 gefunden, wobei die Reinigung durch Gelfiltration oder Elektrophorese einen geringen Anstieg zu Gunsten der Cytochrom-c-Reduktase ergab. Dies steht auch im Einklang mit der Hypothese von GOLF und Mitarb. (1974), daß Rattenlebermikrosomen 2 verschiedene Arten von NADPH-Cytochrom-c-Reduktase enthalten, von denen nur eine die Fähigkeit besitzt, Chinone zu reduzieren, was durch die Reduktion von Koenzym Q_{10} bestimmt worden ist. Folglich kann eine Reinigung der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase auf eine Anreicherung einer dieser Komponenten hinauslaufen, so daß dies zu einem inkonstanten Verhältnis der Reduktion von Cytochrom c zur Reduktion von Chinon führt.

	Cyt c Reduktase Aktivität Rifampicin-chinon "
Mikrosomen von Ratten	9,6
Mikrosomen von mit Rifampicin vorbehandelten Ratten (20 mg/kg über 5 Tage)	9,6
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, solubilisiert und durch Papierelektrophorese gereinigt	10,5
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase, solubilisiert und durch Gelfiltration gereinigt	13,8

Tabelle 4: Verhalten der Reduktaseaktivität bei verschiedenen Mikrosomenpräparationen.

3.5. Induktionsexperimente

An Ratten (OTANI und REMMER, 1975) und bei Menschen (REMMER und Mitarb., 1973) ist gezeigt worden, daß die Aktivität der mikrosomalen NADPH-Cytochrom-c-Reduktase durch kontinuierliche Behandlung mit Rifampicin erhöht wird. Daher wurde die Reduktion von Rifampicinchinon an Lebermikrosomen untersucht, die zuvor über 5 Tage oral 20 mg Rifampicin/kg KG erhalten hatten.

Tabelle 5 zeigt, daß eine solche Behandlung mit Rifampicin zu einem erheblichen Anstieg der Reduktaseaktivität bezogen auf Rifampicin führt. Auf diese Art und Weise kann durch kontinuierliche Behandlung mit Rifampicin die Kapazität des Organismus, Rifampicinchinon wieder zu seiner ursprünglichen Verbindung Rifampicin zu reduzieren, erhöht werden.

	Kontrollen (n = 4)	Mit Rifampicin vorbehandelte Ratten (n = 4)	Irrtumswahrscheinlichkeit p
NADPH-Cytochrom-c-Reduktase	61 ± 16	10 ± 13	$p < 0,01$
Rifampicin-chinon-Reduktase	6,3 ± 0,7	10,7 ± 1,8	$p < 0,005$

Tabelle 5: Bestimmung der mikrosomalen Reduktion von Cytochrom c und Rifampicin-chinon in der Rattenleber.
Die Werte zeigen die mittlere Reduktase - aktivität angegeben in nmol/mg Protein aus Mikrosomen/Minute bei einer Temperatur $T = 37^{\circ}$ C.

4. DISKUSSION

BINDA und Mitarbeiter (1973) haben als wichtigsten Stoffwechselweg im Metabolismus des Rifampicins die Desacetylierung beschrieben.

SUNAHARA und NAKAGAWA (1972) haben aus dem Urin von Patienten, die mit Rifampicin behandelt worden sind, Rifampicinchinon als Stoffwechselprodukt isoliert und identifiziert.

Nach MAGGI und Mitarbeitern (1966) entsteht Rifampicinchinon aus Rifampicin in einer nichtenzymatischen Reaktion.

SUNAHARA und NAKAGAWA (1972) haben noch zusätzlich gezeigt, daß der menschliche Speichel die enzymatische Aktivität besitzt, Rifampicin in Rifampicinchinon zu überführen.

Unsere Experimente zeigen, daß sich Rifampicinchinon irreversibel, vermutlich kovalent, an Proteine bindet. Die Befunde, die wir in Versuchen mit Rattenlebermikrosomen und Rattenleberhomogenat gefunden haben, unterstreichen die Auffassung, daß eine nichtenzymatische, autoxidative Reaktion die irreversible Bindung des Rifampicins an Proteine zur Folge haben kann. Die Bildung eines Chinonderivates, welches sich kovalent an Proteine bindet, ist schon für α-Methyl-Dopa postuliert worden (GOTTLIEB und WURZEL, 1974). Ebenfalls ist gezeigt worden, daß Katechol-östrogene zu einer o-Chinon- oder Semichinonstruktur weiter oxidiert werden können, die sich irreversibel an Proteine bindet (MARKS und HECKER, 1969; BOLT und KAPPUS, 1974).

Bei den Östrogenen geschieht der Mechanismus der irreversiblen Bindung an Proteine höchstwahrscheinlich über die Kopplung des Semichinons an SH-Gruppen (HOPPEN und Mitarb., 1974), während beim Rifampicinchinon eine derartige Reaktion nicht möglich ist, da alle C-Atome des Naphtochinonringes substituiert sind. Daraus kann man folgern, daß die Bindung des Rifampicinchinons an Makromoleküle höchstwahrscheinlich über die Reaktion von Aminogruppen mit der Chinon-carbonyl Struktur geschieht. Diese Ansicht wird auch durch unsere Versuche mit Poly-L-Lysin unterstützt. Da Poly-L-Lysin Rifampicinchinon sogar in einem noch grösseren Ausmaß als Albumin binden kann, kann angenommen werden, daß die freien ε-Aminogruppen des Lysins bei der Bindung an Rifampicinchinon beteiligt sind.

Die Bindung an RNS kann ebenfalls durch eine Reaktion mit funktionellen Aminogruppen der Nukleotide von RNS wie Adenin, Guanin oder Cytosin erklärt werden. Unsere weiteren Experimente zeigen, daß eine irreversible Bindung des Rifampicinmetaboliten an makromolekulare Verbindungen (Proteine, RNS) ebenfalls in vivo stattfindet. Diese irreversible Bindung an Proteine kann als Voraussetzung für die Bildung eines Antirifampicin-Antikörpers angesehen werden, die bei bestimmten pathologischen Reaktionen beschrieben worden ist.

Weiterhin zeigen unsere Untersuchungen, daß die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase eine wichtige Rolle im Stoffwechsel des Rifampicins spielt, weil das reaktive Rifampicinchinon dadurch wieder zu seiner ursprünglichen Verbindung reduziert wird.

Die Affinität dieses Enzyms zu Rifampicinchinon ist etwas geringer als zu anderen Chinonen wie Menadion oder Dichlorphenol-indophenol, die eine Michaeliskonstante $K_m = 10^{-5}$ haben (MASTERS und Mitarbeiter, 1967), während sie für Rifampicinchinon nur $K_m = 10^{-4}$ beträgt.

Durch die Induktion der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase während der ersten Tage der langdauernden Behandlung mit Rifampicin kann das Gleichgewicht zwischen Rifampicin und seinem Chinon wieder verschoben werden, wobei die physiologische Bedeutung dieses Phänomens noch aufzuklären bleibt.

Es ist bekannt, daß nach Gabe von Rifampicin in vivo die höchste Konzentration in der Leber zu finden ist. Nach den Untersuchungen von BINDA und Mitarbeitern (1973) kann errechnet werden, daß bei unseren in vivo Versuchen mit einer Dosis von 20-30 mg Rifampicin/kg KG/Tag eine Konzentration von 0,2-0,3 mM im Rattenlebergewebe erreicht werden kann.

Im Zusammenhang mit diesen hohen Konzentrationen von Rifampicin kann die NADPH-Cytochrom-c-Reduktase wahrscheinlich die Akkumulation des reaktiven Rifampicinchinons in der Leber vermeiden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die vorliegende experimentelle Studie enthält biochemische Untersuchungen zur Frage des Verhaltens des Rifampicinchinons bei der irreversiblen Bindung von Rifampicin an Proteine. Als Versuchstiere wurden weibliche und männliche Albinoratten vom Wistarstamm mit einem Körpergewicht von 200 g und Albinomäuse mit einem Körpergewicht von 30 g benutzt. Zur Induktion der Arzneimittel metabolisierenden Enzyme der Leber sind die Tiere mit Phenobarbital bzw. Rifampicin vorbehandelt worden.

Zusammenfassend läßt sich folgendes feststellen:

1. Wird ^{3}H-Rifampicin mit Mikrosomen oder Homogenat der Rattenleber inkubiert, so werden geringe Mengen irreversibel an Proteine gebunden. Dieser Effekt hängt nicht von der Anwesenheit von NAD, NADH, NADP oder NADPH ab.

2. Rifampicin oxidiert spontan durch Luftsauerstoff bei physiologischem p_H. Als Ergebnis der Autoxidation von Rifampicin entsteht Rifampicinchinon, das bei der Inkubation mit Albumin in erheblich größerem Umfang irreversibel an Proteine gebunden wird. Daraus kann man folgern, daß Rifampicin nach Autoxidation in einer nicht enzymatischen Reaktion irreversibel an Proteine gebunden wird.

3. Bei der Inkubation mit RNS und Poly-L-Lysin wird Rifampicinchinon ebenfalls irreversibel gebunden. Dabei werden vermutlich freie Aminogruppen der Proteine oder der RNS in die Bindung einbezogen.

4. 48 Stunden nach der Gabe von ^{3}H-Rifampicin (33,0 mg/kg) werden 29,2 ± 4,1 pmol irreversibel an 1 mg RNS der Leber gebunden, 15,8 ± 8,1 pmol an 1 mg Leberproteine und 5,0 ± 0,47 pmol an 1 mg Proteine aus Hirngewebe.

5. Die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase reduziert Rifampicinchinon zu Rifampicin. Die Michaeliskonstante dieser Reaktion beträgt $K_m = 10^{-4}$ M.
Nach Induktion der NADPH-Cytochrom-c-Reduktase durch Vorbehandlung der Ratten mit 20 mg Rifampicin/kg KG über 5 Tage steigt die Reduktion von Rifampicinchinon zu Rifampicin entsprechend an.

6. Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß die mikrosomale NADPH-Cytochrom-c-Reduktase die Anhäufung größerer Mengen Rifampicinchinon, die eventuell toxisch sein könnten, durch Reduktion zu Rifampicin verhindert.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BINDA, G., DOMENICHINI, E., GOTTARDI, A., ORLANDI, B., ORTELLI, E., PACINI, B., FOWST, G.: Rifampicin: a general review.
Arzneimittelforschung (Drug Res.) 21, 1907-1978 (1973)

BLAJCHMAN, M.A., LOWRY, R.C., PETTIT, J.E., STRADLING, P.: Rifampicin-induced immune thrombozytopenia.
Br. med. J. 3, 24-26 (1970)

BOLT, H.M.: Nebenwirkungen von Rifampicin und ihre biochemischen Grundlagen.
Dtsch. med. Wschr. 100, 63-65 (1975)

BOLT, H.M., KAPPUS, H.: Irreversible binding of ethinyloestradiol metabolites to protein and nucleic acids as catalysed by rat liver microsomes and mushroom tyrosinase.
J. Steroid. Biochem. 5, 179-184 (1974)

BOLT, H.M., KAPPUS, H., BOLT, M.: Effect of rifampicin-treatment on the metabolism of oestradiol and 17 α-ethinyl oestradiol by human liver microsomes.
Europ. J. clin. Pharmacol. 8, 301-307 (1975)

BRAY, G.A.: A simple efficient liquid scintillator for counting aqueous solutions in a liquid scintillation counter.
Anal. Biochem. 1, 279-285 (1960)

GEORGIEV, G.P., MANTIEVA, V.L.: The isolation of DNA-like RNA and ribosomal RNA from the nucleolo-chromosomal apparatus of mammalian cells. Biochim. biophys. Acta 61, 153-154 (1962)

GOLF, S.W., GRAEF, V., STAUDINGER, H.: Solubilisierung und Anreicherung der NADPH-Cytochrom Reduktase aus Rattenlebermikrosomen. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 355, 1063-1069 (1974)

GOTTLIEB, A.J., WURZEL, H.A.: Protein-quinone interaction: In vitro induction of indirect antiglobulin reactions with methyldopa. Blood 43, 85-97 (1974)

HOPPEN, H.O., SIEKMANN, L., BREUER, H.: Stoffwechsel von Östron in der Mikrosomenfraktion der Rattenleber. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 355, 1305-1315 (1974)

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, M.J., FARR, A., RANDALL, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

MAGGI, N., PASQUALUCCI, C.R., BALOTTA, R., SENSI, P.: Rifampicin, a new orally active rifamycin. Chemotherapia 11, 285-292 (1966)

MARKS, F., HECKER, E.: Stoffwechsel von [4-^{14}C]2-Hydroxy-östron in Rattenlebermikrosomen. Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 350, 69-84 (1969)

MARKS, F., HECKER, E.: Metabolism and mechanism of action of oestrogens.
Biochim. biophys. Acta (Amsterdam) 187, 250-265 (1969)

MASSEY, V.: The microestimation of succinate and the extinction coeffizient of cytochrome c.
Biochim. biophys. Acta 34, 255-256 (1959)

MASTERS, B.S.S., WILLIAMS, C.H., KAMIN, H.: The preparation and properties of microsomal TPNH-cytochrome c reductase from pig liver.
In Oxidation and Phosphorylation, editors: R.W. Estabrook, M.E. Pullman. Methods in Enzymology 10, 565-573 (1967)

NAKAGAWA, H., SUNAHARA, S.: Metabolism of rifampicin in man. 6th Symposion on drug metabolism and action, Tokyo, Pharmaceutical Society of Japan, 94-97 (1974)

OMURA, T., SIEKEVITZ, P., PALADE, G.E.: Turnover of constituents of the endoplasmic reticulum membranes of rat hepatocytes.
J. biol. Chem. 242, 2389-2396 (1967)

OMURA, T., TAKESUE, S.: A new method for simultaneous purification of cytochrome b_5 and NADPH-cytochrome c reductase from rat liver microsomes.
J. Biochem. (Tokyo) 67, 249-257 (1970)

OTANI, G., REMMER, H.: Participation of microsomal NADPH-cytochrome-c-reductase in the metabolism of rifampicin.
Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmac. 287, R 76 (1975)

POOLE, G., STRADLING, P., WORLLEDGE, S.: Potentially serious side effects of high dose twice-weekly rifampicin.
Brit. Med. J. 3, 343-347 (1971)

PYJET, J.C., HOMBERG, J.C., DECROIX, G.: Sinsitivity to rifampicin: Incidance, mechanism, and prevention.
Brit. Med. J. 2, 415-418 (1974)

REMMER, H., GREIM, H., SCHENKMAN, J.B., ESTABROOK, R.W.: Methods for the elivation of hepatic microsomal mixed function oxidase levels and cytochrom P-450.
In: Estabrook, R.W., Pullman, M.E. (Editors): Oxydation and Phosphorylation. Methods in Enzymology 10, 703-708 (1967)

REMMER, H., SCHOENE, B., FLEISCHMANN, R.A.: Induction of the unspecific microsomal hydroxylase in the human liver.
Drug Metabolism and Disposition 1, 224-230 (1973)

SCHUBOTHE, H., SEUFERT, C.D., WEBER, S.: Chinin- und Rifampicin-spezifische Antikörper mit hämolytischem Effekt.
Verh. dt. Ges. inn. Med. 78, 905-908 (1972)

SHERRER, K., DARNELL, J.E.: Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from hela cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 486-490 (1962)

SUNAHARA, S., NAKAGAWA, H.: Metabolic study and controlled clinical trials of rifampicin. Chest 61, 526-531 (1972)

WILLIAMS, C.H., KAMIN, H.: Microsomal triphosphopyridine nucleotide-cytochrome-c-reductase of liver. J. biol. Chem. 237, 587-595 (1962)

Lebenslauf

Am 21. Juni 1953 wurde ich, Hildegard Gassenmaier, als zweites Kind des Dr. med. Herbert Remmer und der Ärztin Ingeborg Remmer, geb. Flemming, in Berlin geboren. Nach vier Volksschuljahren (1959-1963) besuchte ich 1 1/2 Jahre (1963-1964) das Humanistische Gymnasium zu Berlin-Steglitz.

Meine weitere Schulausbildung, die ich im Sommer 1971 mit dem Abitur abschloß, erhielt ich am Uhland-Gymnasium in Tübingen.

Im Oktober 1971 begann ich das Medizinstudium an der Universität Tübingen und legte dort im September 1972 die naturwissenschaftliche Vorprüfung ab. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich im Oktober 1973.

Am 27. August 1976 heiratete ich den Medizinalassistenten Dr.med. Theodor Gassenmaier.

Am 12. Oktober 1977 bestand ich die ärztliche Prüfung in Tübingen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Bolt für das interessante Thema sowie für seine wertvolle Beratung und großzügige Unterstützung bei der Durchführung meiner Dissertation.